

( Translation )

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

RECEIVED  
TECH CENTER 1600/2900  
00 FEB 11 AM 2:40

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: December 15, 1998

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 355956/1998

Applicant(s): Hitachi Software Engineering Co., Ltd.

November 19, 1999

Commissioner,  
Patent Office

Takahiko Kondo (seal)

Certificate No. 11-3079041



日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年12月15日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第355956号

出願人

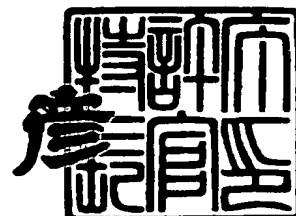
Applicant(s):

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

1999年11月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3079041

【書類名】 特許願

【整理番号】 10B030

【提出日】 平成10年12月15日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/00

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション検出方法及びバイオチップ

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

【氏名】 百合野 以子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

【氏名】 山本 顕次

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

【氏名】 伊藤 敏明

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

【氏名】 渡辺 敏正

【特許出願人】

【識別番号】 000233055

【氏名又は名称】 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100102576

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 敏章

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9722155

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション検出方法及びバイオチップ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プローブとサンプルとのハイブリダイゼーションを検出するハイブリダイゼーション検出方法において、

プローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量とを検出することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項2】 プローブとサンプルとのハイブリダイゼーションを検出するハイブリダイゼーション検出方法において、

プローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量との差分を検出することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項3】 請求項1又は2記載のハイブリダイゼーション検出方法において、ハイブリダイゼーションを行う前にプローブの量を検出し、ハイブリダイゼーション終了後に前記プローブに結合したサンプルの量を検出することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項4】 請求項1又は2記載のハイブリダイゼーション検出方法において、ハイブリダイゼーション終了後にプローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量を検出することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項5】 請求項1又は2記載のハイブリダイゼーション検出方法において、プローブとサンプルに各々異なる検出用の標識が付けられていることを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項6】 請求項2記載のハイブリダイゼーション検出方法において、検出されたプローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量との差分をディスプレイに表示することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項7】 蛍光物質で標識したプローブをスポットしたことを特徴とするバイオチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、サンプル生体高分子とプローブ生体高分子とのハイブリダイゼーションを利用してサンプル生体高分子に目的とする配列が存在するか否かを分析するハイブリダイゼーション検出法、及びそれに用いられるバイオチップに関する。

【0002】

【従来の技術】

従来から、生体内の分子を同定・分画するために、特に目的DNAの検出、あるいは遺伝子DNAの有無検出などのために、既知の配列をもつ核酸や蛋白質をプローブとしてハイブリダイズする方法が多く用いられてきた。ハイブリダイゼーション検出の方法は、固定したプローブDNAに蛍光物質を標識したサンプルDNAを入れてハイブリダイズさせる。サンプルDNAがプローブDNAに結合すると、プローブDNAと一緒に固定され、光源からの励起光で蛍光物質を励起し、発光する蛍光を検出することでハイブリダイゼーションを検出していた。

【0003】

図7、図8、図9は、この従来のハイブリダイゼーション検出方法の原理を説明する図である。図7に示すように、一定量のプローブDNA 1aをガラスプレート4にスポット3aとして固定化する。別種のプローブDNA 1b、プローブDNA 1cも同様に、スポット3b、スポット3cとして固定化する。このとき、各スポット1a、1b、1cのプローブDNAを全て同量にして固定化することはできない。

【0004】

図8(a)に示すように、全てのサンプルDNA 5を蛍光物質6で標識する。図8(b)に示すように、プローブDNAとサンプルDNAをハイブリダイズさせるために、スポットされたガラスプレート4と蛍光標識したサンプルDNA 5をハイブリダイゼーション溶液7に入れ、ハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション溶液7は、ホルムアルデヒド、SSC (NaCl, trisodium citrat

e)、SDS (sodium dodecyl sulfate)、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、蒸留水などからなる混合液であり、混合比率は使用するDNAの性質により異なる。

#### 【0005】

このとき図8(c)に示すように、サンプルDNA 5とプローブDNAが相補鎖であればプローブDNA 1a, 1bのようにハイブリダイゼーションして二重らせん構造で結合する。一方、両者が相補鎖DNAでなければ、プローブDNA 1cのようにサンプルDNA 5が結合しないでそのままである。ハイブリダイゼーションの検出は、図9に示すように、励起光源としてのランプ9からの励起光でガラスプレート4を照射して蛍光物質6を励起し、発光波長域以外の光を光学フィルター10でカットして、各スポットからの発光をCCDカメラなどの二次元光センサー8で検出する。

#### 【0006】

この時、ハイブリダイゼーションが生じたスポット3a, 3bには蛍光物質6が存在するため、ランプ9からの励起光によって蛍光物質6が励起され、発光が検出される。一方、ハイブリダイゼーションが生じていないスポット1cには蛍光物質が存在しないため、ランプ9からの励起光照射によっても発光は生じない。このようにして、ハイブリダイゼーションが生じたか否かによってスポット毎に明暗が観察される。二次元光センサー8からの画像データは、コントローラ12によってコンピュータ13に転送され、ディスプレイに画像表示される。

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

プローブDNAをガラスプレートに固定化するとき、全てのプローブを同じ量ずつ均等にスポットすることはできないため、プローブが多量に固定化されたスポットと少量に固定化されたスポットとではプローブDNAの量が異なる。このため、ハイブリダイゼーションの検出ではサンプルDNAがハイブリダイズしたか否かは判断できるが、どの位のプローブDNAにどの程度のサンプルDNAがハイブリダイズしたか定量的な測定を行うことはできなかった。

本発明は、このような従来技術の問題点に鑑みなされたもので、プローブDN

AとサンプルDNAがどの程度ハイブリダイズしたか、定量的な測定が可能な検出方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するため、本発明では、プローブ生体高分子とサンプル生体高分子に各々異なる蛍光物質を標識し、蛍光物質の発光波長が異なることを利用して各スポット毎に、そのスポットに存在しているプローブ生体高分子とサンプル生体高分子を別々に検出できるようにする。また、ハイブリダイゼーションの検出で、プローブ生体高分子を標識している蛍光物質の発光波長とサンプル生体高分子を標識している蛍光物質の発光波長を分離検出することにより、各スポット毎にプローブ生体高分子の量及びそのプローブ生体高分子にハイブリダイズしたサンプル生体高分子の量を個別に検出して定量測定することを可能とする。

【0009】

すなわち、プローブ生体高分子を標識した蛍光物質を発光させてガラスプレートのスポットに固定化されたプローブ生体高分子の量を求め、更にサンプル生体高分子を標識した蛍光物質を発光させてプローブ生体高分子にハイブリダイズしたサンプル生体高分子の量を求める。そして、その差分で基板上にスポットされたプローブ量に対して、サンプルがどれくらいハイブリダイズしたかを測定する。ここで生体高分子とは、DNA、RNA、蛋白質など、生体を構成する高分子をいう。

【0010】

以上をまとめると、本発明によるハイブリダイゼーション検出方法は、プローブとサンプルとのハイブリダイゼーションを検出するハイブリダイゼーション検出方法において、プローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量とを検出することを特徴とする。

本発明によるハイブリダイゼーション検出方法は、また、プローブとサンプルとのハイブリダイゼーションを検出するハイブリダイゼーション検出方法において、プローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量との差分を検出することを特徴とする。

【0011】

プローブの量とプローブに結合したサンプルの量の検出は、ハイブリダイゼーションを行う前にプローブの量を検出し、ハイブリダイゼーション終了後にプローブに結合したサンプルの量を検出するようにしてもよいし、ハイブリダイゼーション終了後にプローブの量とプローブに結合したサンプルの量を共に検出するようにしてもよい。

【0012】

プローブの量とプローブに結合したサンプルの量の検出は、プローブとサンプルに各々異なる検出用の標識が付けておき、その標識を検出することで行うことができる。

検出されたプローブの量とプローブに結合したサンプルの量との差分はディスプレイに表示することができる。

本発明によるバイオチップは、蛍光物質で標識したプローブをスポットしたことを特徴とする。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態について説明する。ここでは、本発明の一例として、プローブ生体高分子及びサンプル生体高分子が共にDNAである場合について説明するが、DNA以外のRNAや蛋白質に対しても本発明が同様に適用可能であるのは勿論である。

図1～図3は、本発明によるハイブリダイゼーション検出方法の一例の原理を説明する図である。図1に示すように、全てのプローブDNA 1a, 1b, 1cに同一の蛍光物質2を標識する。蛍光物質2としては、例えばイソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) を使用する。プローブDNA 1aをガラスプレート4にスポット3aとして固定化し、別種のプローブDNA 1b、プローブDNA 1cも同様に、スポット3b、スポット3cとしてガラスプレート4に固定化する。

【0014】

また、図2(a)に示すように、サンプルDNAは全てのサンプルDNA 5を

蛍光物質 6 で標識する。蛍光物質 6 としては、例えば Cy 5 を使用する。ハイブリダイゼーションに当たっては、図 2 (b) に示すように、プローブ DNA とサンプル DNA をハイブリダイズさせるために、プローブ DNA がスポットされたガラスプレート 4 と蛍光標識したサンプル DNA 5 とをハイブリダイゼーション溶液 7 に入れ、ハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション溶液 7 は、ホルムアルデヒド、SSC (NaCl, trisodium citrate)、SDS (sodium dodecyl sulfate)、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、蒸留水などからなる混合液であり、混合比率は使用する DNA の性質により異なる。

## 【0015】

このとき、サンプル DNA 5 とプローブ DNA が相補鎖であれば、図 2 (c) に示すスポット 3 a のプローブ DNA 1 a やスポット 3 b のプローブ DNA 1 b のように、サンプル DNA 5 とハイブリダイゼーションして二重らせん構造で結合する。一方、両者が相補鎖 DNA でなければ、図 2 (c) に示すスポット 3 c のプローブ DNA 1 c のように、サンプル DNA 5 が結合しないでそのままである。つまり、ハイブリダイゼーションが生じたスポット 3 a や 3 b には、プローブ DNA 1 a, 1 b を標識している蛍光物質 2 と、プローブ DNA 1 a, 1 b に結合したサンプル DNA 5 を標識している蛍光物質 6 が存在する。一方、ハイブリダイゼーションが生じていないスポット 3 c には、プローブ DNA 1 c を標識している蛍光物質 2 のみが存在する。

## 【0016】

ハイブリダイゼーションの検出は、図 3 に示すように、励起光源としてのランプ 9 からの励起光でサンプルを標識する蛍光物質 6 とプローブ DNA を蛍光物質 2 を励起して発光させる。励起光源のランプとしては例えば、発光波長域が約 300-約 700 nm であるキセノンランプを使用する。これは、FITC が励起波長 490 nm、発光波長 520 nm であり、Cy 5 が励起波長 650 nm、発光波長 667 nm であるため、両方の蛍光物質を同時に発光させることができるからである。発光の検出にあたっては、FITC の発光を読み取る時は透過波長 520 nm の光学フィルター 10 を、Cy 5 の発光を読み取る時は透過波長 667 nm の光学フィルター 11 を用いて二次元光センサー 8 で読み取る。二次

元光センサー 8 からのデータは、コントローラ 12 によってコンピュータ 13 へ転送される。二次元光センサー 8 としては例えば CCD カメラを使用し、2 枚の光学フィルター 10, 11 はステージ 14 の駆動によって矢印の方向に移動され、交換される。

## 【0017】

コンピュータ 13 では、FITC の発光を読み取ったデータ値から各スポットにおけるプローブ DNA の量を求め、Cy 5 の発光を読み取ったデータ値から各スポットにおいてプローブ DNA とハイブリダイズしたサンプル DNA の量を求める。FITC の発光量  $A_i$  から Cy 5 の発光量  $B_i$  を引いて差分  $C_i$  ( $C_i = A_i - B_i$ ) を取れば、プローブ DNA 量からの相対値でハイブリダイズしたサンプル DNA 量を求めることができ、高精度な定量測定ができる。

## 【0018】

上記差分  $C_i$  を計算することにより、差分  $C_i$  ( $C_i = A_i - B_i$ ) の値が大きいほどプローブ DNA にハイブリダイズしたサンプル DNA の量が少ないことを意味し、反対に差分  $C_i$  の値が小さいほどプローブ DNA にハイブリダイズしたサンプル DNA の量が多い、即ちプローブ DNA と相補性があると判断できる。ここで、差分として  $C_i = (A_i - B_i)$  を採用したのは、プローブ DNA 量からハイブリダイズしたサンプル DNA 量を引いた方が比較を簡単に行えるからである。つまり、どんな状態でもハイブリダイズしたサンプル DNA 量よりプローブ DNA 量の方が多いし、また、全てのスポットにおいて、プローブ DNA 量はある程度一定であるため、比較しやすいからである。

## 【0019】

図 4 は、差分の処理の手順を示すフローチャートである。ステップ 11 において、発光量の相対値を計算するスポットの番号を初期設定する。ステップ 12 では、スポット  $i$  の FITC の発光量  $A_i$  と Cy 5 の発光量  $B_i$  を求める。ステップ 13 では、発光値の差分  $C_i$  ( $= A_i - B_i$ ) を計算し、発光量の相対値を求める。発光値の相対値 (差分  $C_i$ ) はハイブリダイズしなかったプローブ DNA 量に対応し、これからサンプル DNA とプローブ DNA との相補性の程度を判断することができる。ステップ 14 では、求めた相対値  $C_i$  をコンピュータ 13 の

表示部に階調として表示する。このとき、相対値の大きい値は明るく、小さい値は暗く表示する。また、ポジフィルムのようにその反対で表示してもよい。ステップ 15 では、全てのスポットを処理したかチェックし、全てのスポットの処理が終了してないときはステップ 16 で次のスポットの位置を求め、ステップ 12 からの処理を繰り返す。全てのスポットの計算が終了したときは処理を終了する。

#### 【0020】

図 5 及び図 6 は、本発明による検出方法の他の例の原理を説明する図である。この検出方法は、ハイブリダイゼーションする前にプローブ DNA の量、すなわちプローブ DNA に標識した FITC 等の発光量を読み取っておき、ハイブリダイゼーション後、サンプル DNA の量、すなわちサンプル DNA に標識した Cy5 等の発光量を読み取り、差分を求める方法である。

#### 【0021】

図 5 (a) に示すように、例えば FITC のような蛍光物質で標識したプローブ DNA をスポット 3a, 3b, 3c, … としてガラスプレート 4 に固定化する。これは、先に図 1 にて説明したのと同様の方法で行う。次に、ハイブリダイゼーション前に各スポット 3a, 3b, 3c, … のプローブ DNA の量を読み取るため、図 5 (b) に示すように、ランプ 9 からの励起光を照射してプローブ DNA に標識した FITC の発光を二次元光センサー 8 で読み取る。このとき、二次元光センサー 8 の光路中には透過波長 520 nm の光学フィルター 10 を配置する。これは、先に図 3 によって説明した FITC の発光読み取りと同様にして行われる。読み取った各スポットの発光量データ  $A_i$  は、フロッピーディスク 14 などの記憶媒体に格納しておく。

#### 【0022】

例えば Cy5 からなる蛍光物質 6 で標識したサンプル DNA 5 とプローブ DNA とのハイブリダイゼーションは、図 6 (a) に示すように、図 2 (b) で説明したのと同様にして行われる。ハイブリダイゼーションの検出は、図 6 (b) に示すように、ランプ 9 からの励起光でガラスプレート 4 を照射し、Cy5 からの発光を二次元光センサー 8 で読み取ることによって行われる。このとき、二次元

光センサー 8 の光路中には透過波長 667 nm の光学フィルター 11 を配置する。これは、図 3 で説明した Cy 5 の発光読取りと同様である。このあと、フロッピーディスク 14 に格納されている FITC の発光量データ  $A_i$  を読み込み、Cy 5 の発光量データ  $B_i$  との差分をとる。差分の取り方は、図 3 に示す処理と同様であり、この方法によっても差分による定量測定ができる。

#### 【0023】

この方法は、ガラスプレート 4 にどの程度プローブ DNA が固定化されたか、ハイブリダイゼーションを行う前に分かるため、サンプル DNA の量をどの程度にしてハイブリダイゼーションすればよいか、また、プローブ DNA が固定化できなかった無効なスポットの位置などをハイブリダイゼーション前に知ることができるため、事前の対処ができ、効率の良い実験ができる。

#### 【0024】

##### 【発明の効果】

本発明によると、スポットされたプローブ DNA の量と、プローブ DNA にハイブリダイゼーションしたサンプル DNA の量を知ることができ、その差分をとることでより厳密なハイブリダイズ量（相補性の程度）を計算でき、プローブ DNA に結合したサンプル DNA の量を高精度に測定することができる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

本発明によるハイブリダイゼーション検出方法の一例の原理を説明する図。

##### 【図 2】

本発明によるハイブリダイゼーション検出方法の一例の原理を説明する図。

##### 【図 3】

本発明によるハイブリダイゼーション検出方法の一例の原理を説明する図。

##### 【図 4】

差分の処理の手順を示すフローチャート。

##### 【図 5】

本発明による検出方法の他の例の原理を説明する図。

【図 6】

本発明による検出方法の他の例の原理を説明する図。

【図 7】

従来のハイブリダイゼーション検出方法の原理を説明する図。

【図 8】

従来のハイブリダイゼーション検出方法の原理を説明する図。

【図 9】

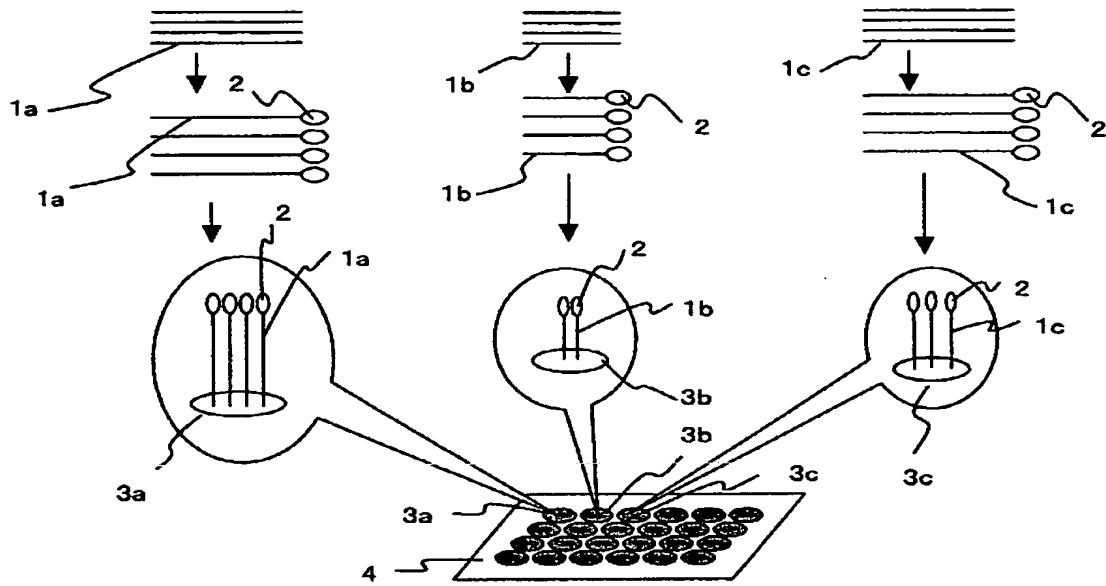
従来のハイブリダイゼーション検出方法の原理を説明する図。

【符号の説明】

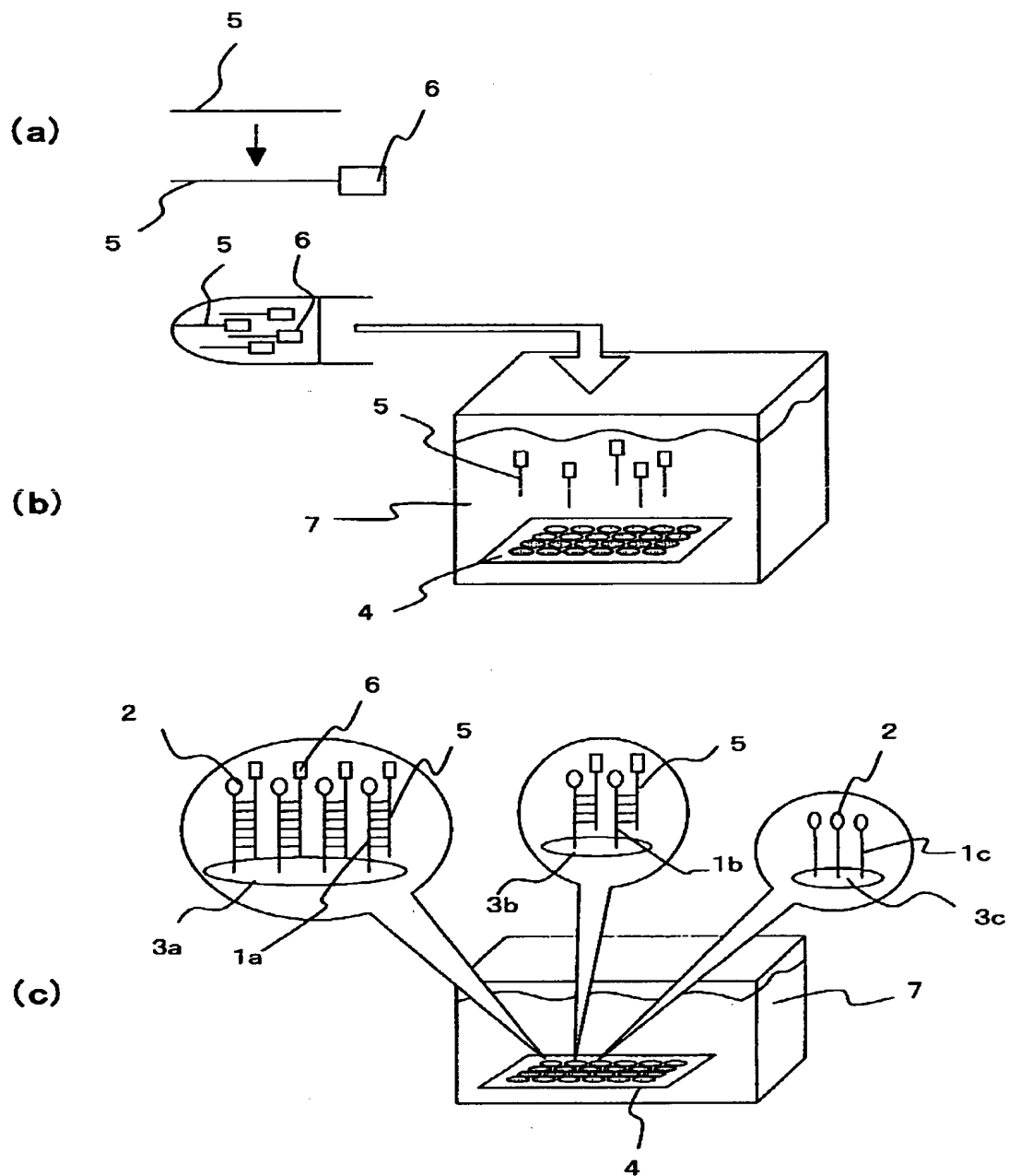
1 a, 1 b, 1 c…プローブDNA、2…蛍光物質、3 a, 3 b, 3 c…プローブDNAのスポット、4…ガラスプレート、5…サンプルDNA、6…蛍光物質、7…ハイブリダイゼーション溶液、8…二次元光センサー、9…励起光源、10, 11…光学フィルター、12…コンピュータ、13…コントローラ、14…フロッピーディスク

【書類名】 図面

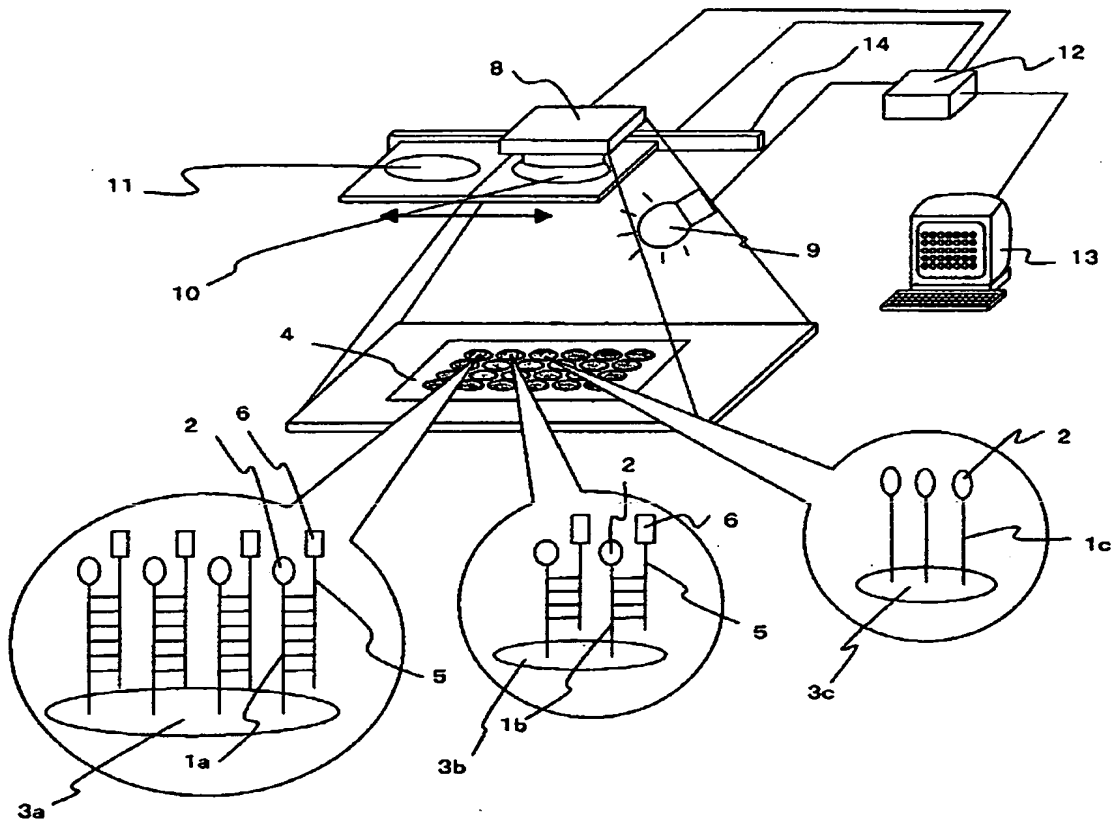
【図 1】



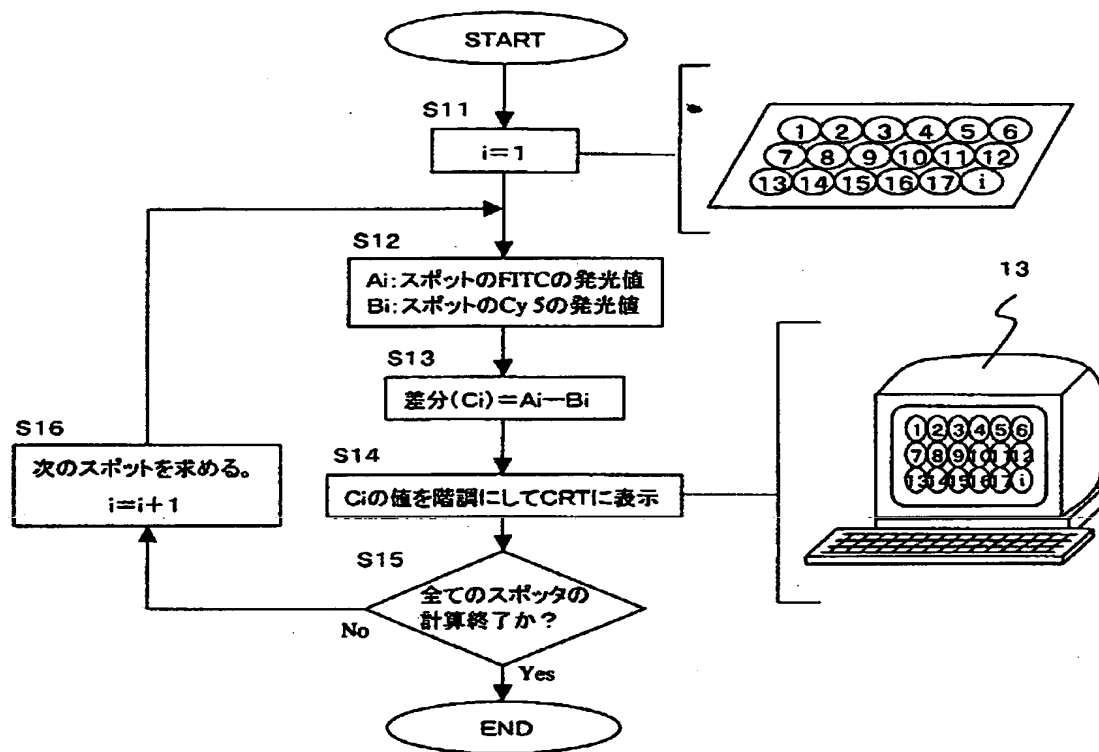
【図 2】



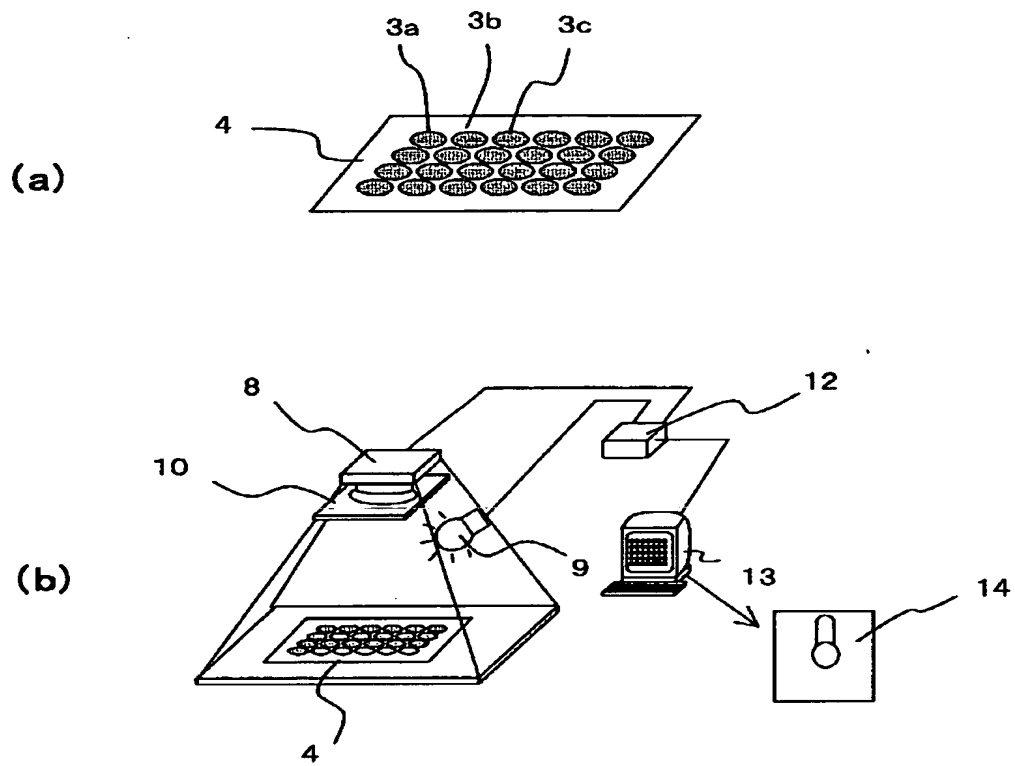
【図 3】



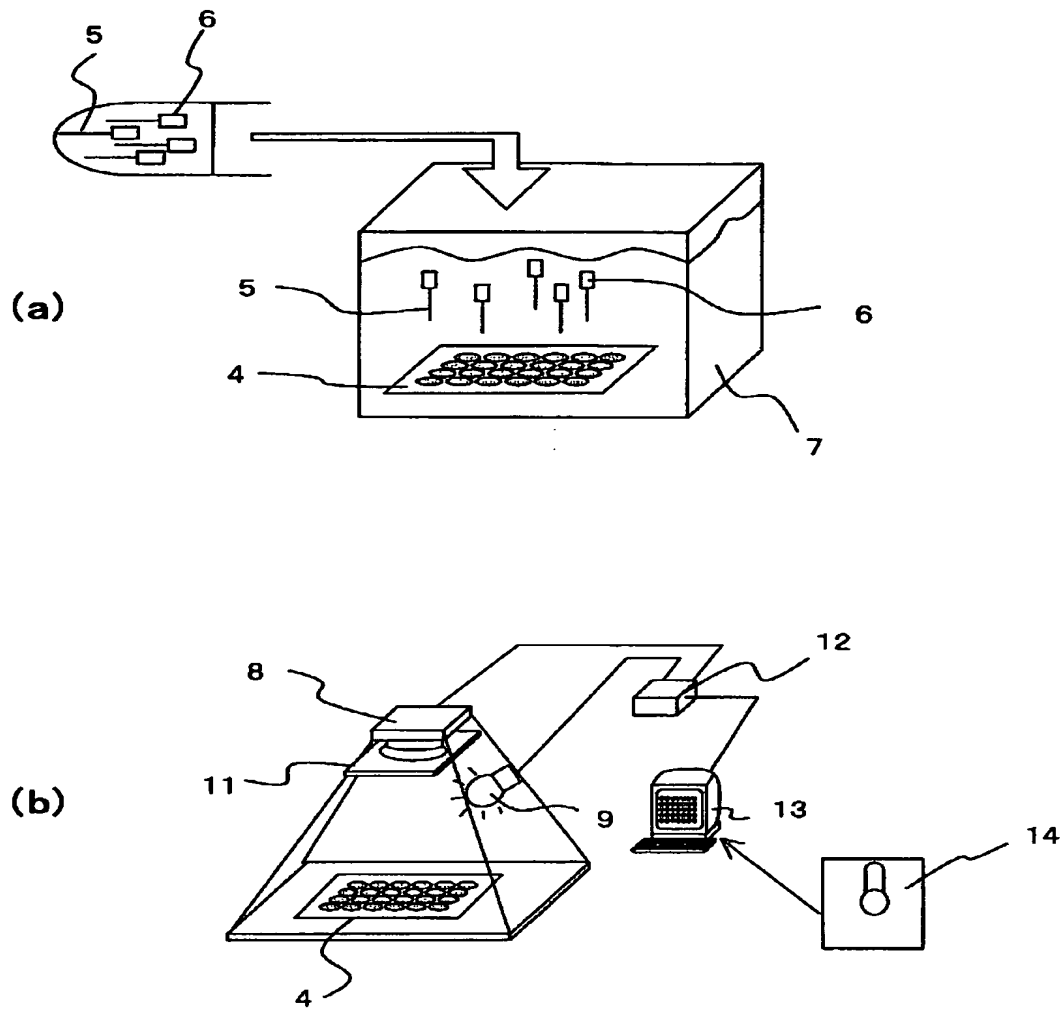
【図 4】



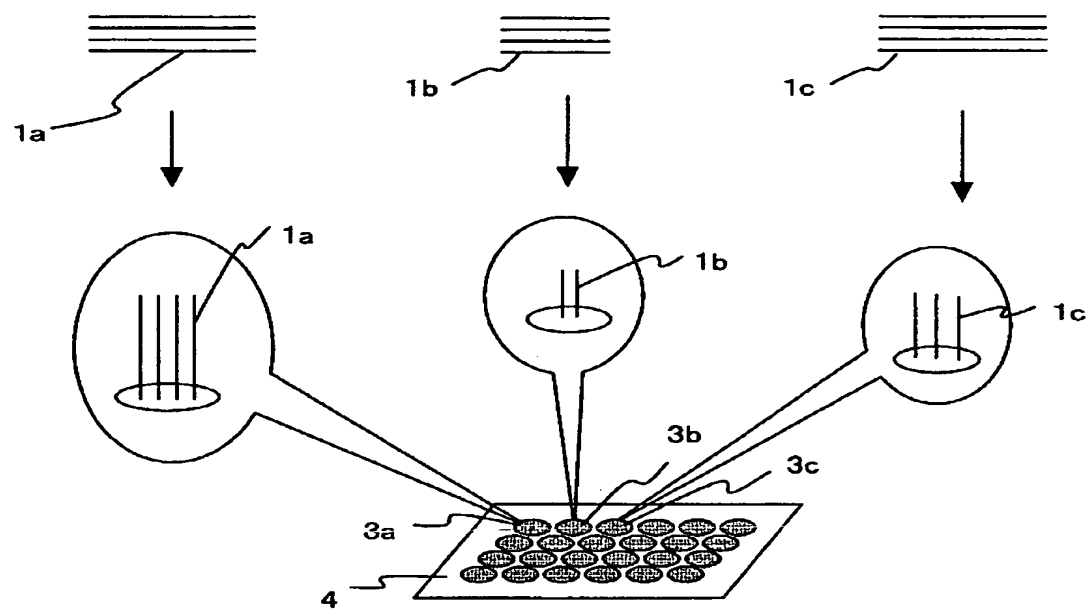
【図 5】



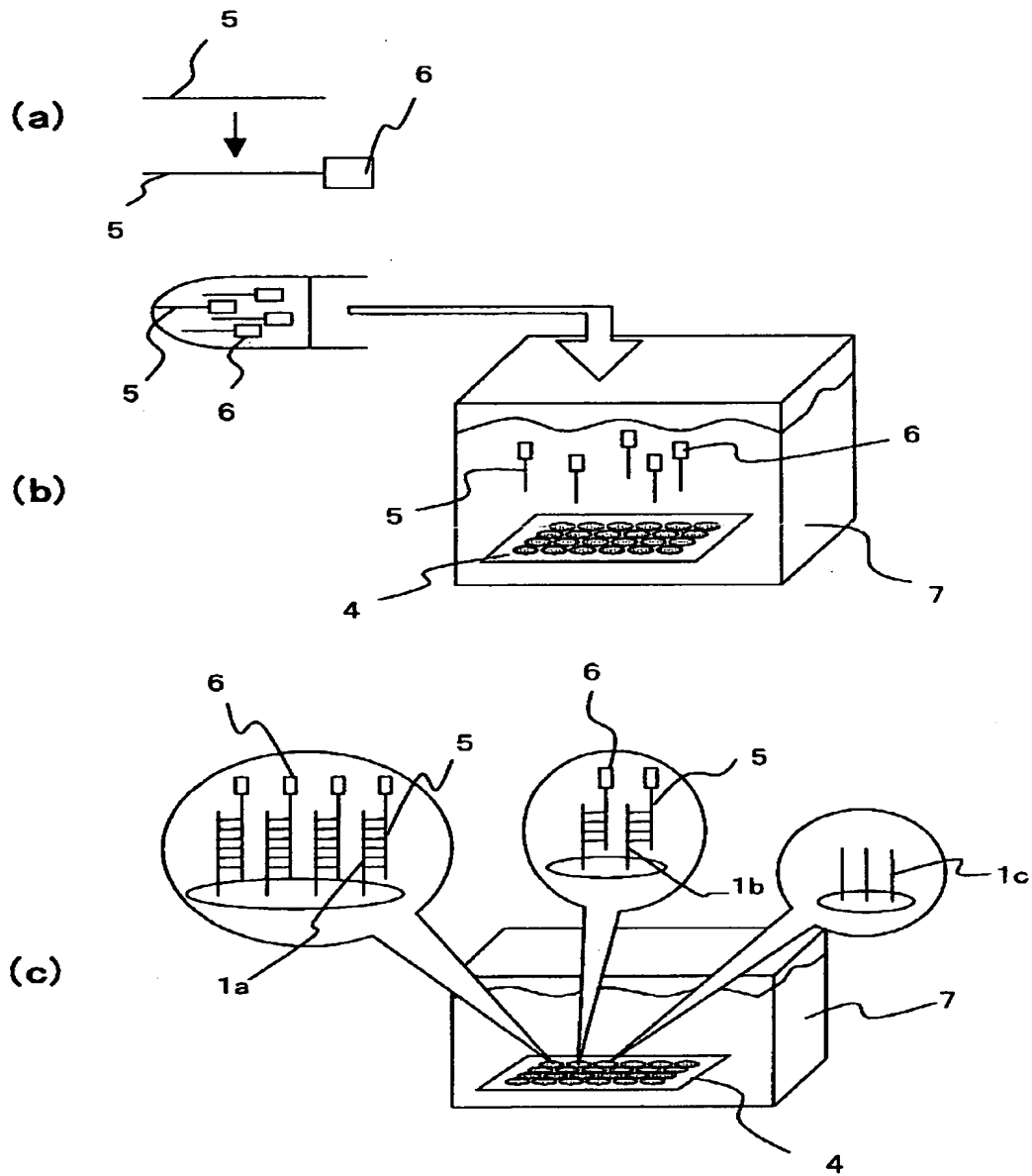
【図 6】



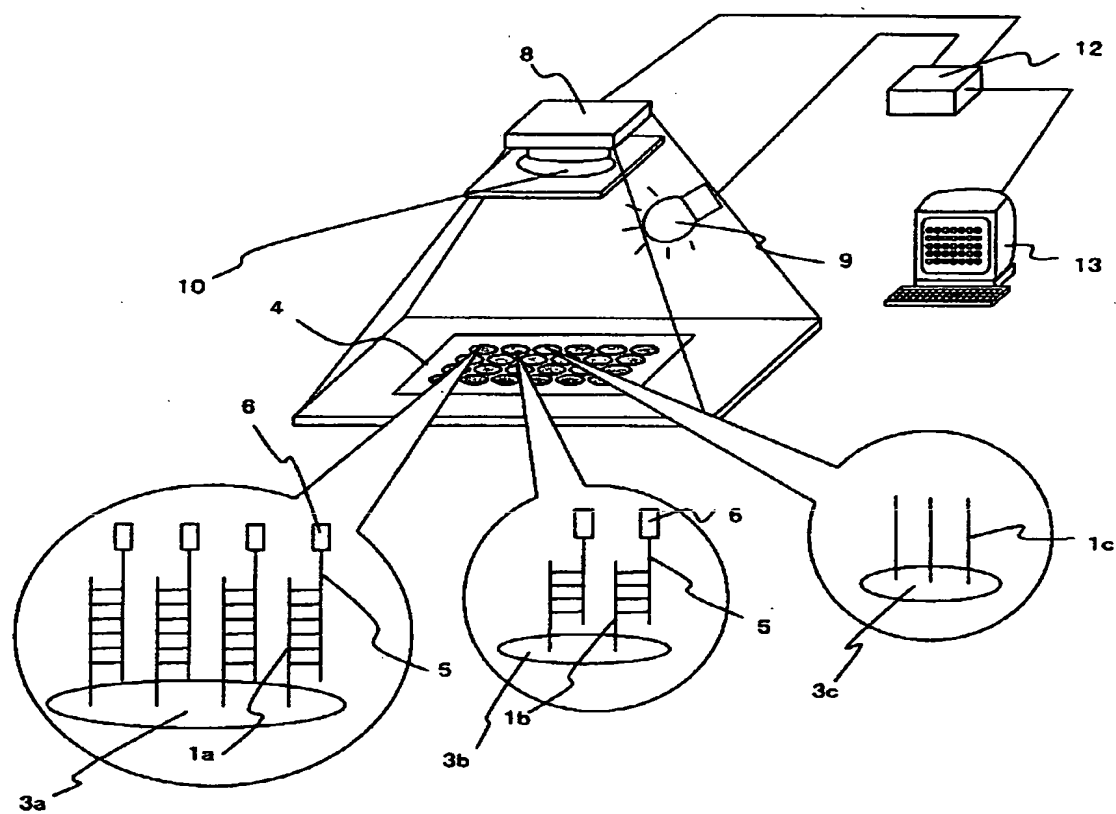
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プローブDNAとサンプルDNAがどの程度ハイブリダイズしたか、定量的な測定を可能とする。

【解決手段】 プローブ1a, 1b, 1cを標識した蛍光物質2を発光させてガラスプレート4のスポット3a, 3b, 3cに固定化されたプローブの量を求め、更にサンプル5を標識した蛍光物質6を発光させてプローブにハイブリダイズしたサンプルの量を求める。そして、その差分で基板上にスポットされたプローブ量に対して、サンプルがどれくらいハイブリダイズしたかを測定する。

【選択図】 図3

認定・付加情報

特許出願の番号	平成10年 特許願 第355956号
受付番号	59800812294
書類名	特許願
担当官	清水 スズ子 1350
作成日	平成11年 3月15日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000233055
【住所又は居所】	神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
【氏名又は名称】	日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100091096
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】	平木 祐輔
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100102576
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】	渡辺 敏章
----------	-------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000233055]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地  
氏 名 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社